

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra Biochemie



**Molekulární mechanismus aktivace MST1 kinázy v nádorových
buňkách**

Molecular mechanism of MST1 kinase activation in cancer cells

Bakalářská práce

Jitka Smetanová

Vedoucí práce: Mgr. Karel Vališ, Ph.D.

Praha 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Mgr. Karla Valíše, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

V Praze dne:

Podpis:

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli Mgr. Karlu Vališovi, Ph.D. za ochotu, trpělivost a za čas, který mi věnoval především v průběhu experimentální části této práce. Můj dík patří také příteli Pavlu Matysovi za korekturu českého jazyka.

Dále bych ráda poděkovala celé své rodině za podporu nejen při psaní této práce, ale i v průběhu celého studia.

Abstrakt

MST1 kinasa je nedílnou součástí Hippo signální dráhy. Hippo dráha je evolučně konservovaná, reguluje růst tkání a orgánů, ovlivňuje proliferaci a apoptosu. Pokud je MST1 aktivní, fosforyluje onkoproteiny YAP a TAZ, které v nefosforylovaném stavu regulují transkripční faktory TEAD a SMAD. Dále aktivní MST1 kinasa fosforyluje FOXO transkripční faktory a indukuje jejich translokaci do buněčného jádra. Aktivace MST1 kinasy ve finále způsobuje buněčnou apoptosu nebo zástavu buněčného cyklu v G1 fázi. Podmínkou aktivace MST1 je jeho autofosforylace a štěpení. V dnešní době existuje několik článků, které se problematikou aktivace MST1 zabývají. Některé z nich popisují aktivaci MST1 působením efektorových kaspas-3 a -7, naopak nejnovější články tvrdí, že samotný MST1protein je zodpovědný za aktivaci kaspas. V rámci této bakalářské práce byl studován molekulární mechanismus aktivace MST1 proteinu. K aktivaci MST1 byla využita biologicky aktivní látka GDC-0941. Dále byla inhibována aktivita kaspas specifickým inhibitorem Z-DEVD a pomocí metody elektropřenosu proteinů s následnou imunodetekcí bylo prokázáno, že MST1 je aktivní i v případě, kdy kaspasy jsou specificky inhibovány. Tento fakt poukazuje na možnou úlohu dalších proteas v procesu aktivace MST1 proteinu.

Klíčová slova: MST1 kinasa, kaspasy, leukemie, buněčná smrt

Abstract

MST1 kinase is an internal part of the Hippo signal pathway. The Hippo pathway is an evolutionary conserved regulator of tissue and organ growth and affects proliferation and apoptosis. Active MST1 kinase phosphorylates YAP and TAZ oncoproteins, which regulate the activity of transcription factors in their unphosphorylated state, including TEAD and SMAD. Furthermore active MST1 kinase phosphorylates FOXO transcription factors and induces their translocation into the cell nucleus. Finally the activation of MST1 kinase leads to cell apoptosis or halt cell cycle in G1 phase. Activation of MST1 protein depends on its auto-phosphorylation and cleavage. Recently, there are several articles which take interest in the issue of activation of MST1. Some of them describe the activation of MST1 by the effector caspase-3 and -7, on the other hand the latest articles argue that MST1 kinase itself is responsible for the activation of caspases. The molecular mechanism of MST1 kinase activation was studied in this bachelor thesis. We used the biologically active compounds GDC-0941 for the activation of MST1 protein. The activity of caspase was inhibited by specific inhibitor Z-DEVD. Using electrophoresis and Western blot it was demonstrated that MST1 is active in the case when caspases are inhibited. This fact points to the possible role of other protease in the process of activation of MST1 kinase.

(In Czech)

Keywords: MST1 kinase, caspase, leukemia, cell death

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Seznam použitých zkratk	8
1. Úvod	13
1.2. Buněčná signalizace.....	14
1.2.1. Mezbuněčná signalizace	14
1.2.2. Vnitrobuněčná signalizace	15
1.3. Apoptosa	25
1.3.1. Vnější dráha	25
1.3.2. Vnitřní dráha	25
1.3.3. Vztah mezi apoptosou a Hippo/MST1 signalizací	27
2. Cíl práce.....	29
3. Materiál a metody	30
3.1. Přístroje a materiál	30
3.1.1. Biologický materiál.....	30
3.1.2. Přístroje a příslušenství.....	30
3.1.3. Chemikálie	31
3.2. Metody	33
3.2.1. Kultivace a pasážování buněk.....	33
3.2.2. Příprava celobuněčného lyzátu	33
3.2.3. Příprava cytosolické frakce.....	33
3.2.3. Kvantifikace proteinů	34
3.2.4. SDS elektroforéza	35
3.2.5. Přenos proteinů	35
3.2.6. Měření proteolytické aktivity.....	37

4.	Výsledky	39
4.1.	Stanovení koncentrace	39
4.2.	Vliv GDC na aktivaci MST1	39
4.3.	Proteolytická aktivita	40
4.4.	Imunodetekce MST1 po inhibici kaspas	41
5.	Diskuse	43
6.	Závěr	45
7.	Seznam použité literatury	46

Seznam použitých zkratk

14-3-3	proteiny náležící do rodiny konzervovaných regulačních molekul
α -TOS	derivát vitamínu E (z angl. α -tocopheryl succinate)
β -TrCP	protein mající důležitou roli v regulaci buněčného cyklu
AIF	faktor indukující apoptosu (z angl. apoptosis-inducing factor)
AKT	serin-threoninová kinasa
Apaf-1	protein mající úlohu v procesu apoptosy (z angl. apoptic protease activating factor 1)
APC	negativní regulátor Wnt dráhy (z angl. adenomatous polyposis coli)
APS	peroxodisíran amonný (z angl. ammonium persulfate)
ASK-1	(z angl. apoptosis signal-regulating kinase 1)
ATM	serin-threoninová kinasa (z angl. ataxiatelangiectasia mutated protein)
ATP/dATP	adenosintrifosfát/deoxyadenosintrifosfát
ATR	serin-threoninová kinasa (z angl. ATM-Rad3-related)
BAK	pro-apoptický protein rodiny Bcl-2
BAX	pro-apoptický protein rodiny Bcl-2
BOK	pro-apoptický protein rodiny Bcl-2
BID	proapoptický Bcl-2 protein obsahující pouze BH3 doménu (z angl. BH3 interacting-domain death agonist)
BIM	pro-apoptický protein (z angl. Bcl-2-like protein 11)
BLC-2	skupina evolučně příbuzných proteinů, anti-apoptický protein (z angl. B-cell lymphoma 2)
BLC-xL	anti-apoptický protein (z angl. B-cell lymphoma-extra large)

BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)
CK1 α /CK1 γ	(z angl. casein kinase)
CRD	doména bohatá na cystein (z angl. cystein rich domains)
DEVD	kolorimetrický substrát pro kaspasu-3
DISC	multiproteinový komplex (z angl. death-inducing signaling complex)
DMSO	dimethylsulfoxid
Dvl	cytoplasmatický fosfoprotein z rodiny Dishevelled
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGFR	receptor na povrchu buněk (z angl. epidermal growth factor receptor)
ERK	protein kinasa (z angl. extracellular–signal–regulated kinase)
FAS	transmembránový protein náležící do TNF rodiny proteinů
FASL	FAS ligand
FADD	protein zodpovědný za tvorbu DISC (z angl. Fas-Associated protein with Death Domain)
FBS	fetální hovězí sérum (z angl. fetal bovine serum)
FOXO	transkripční faktory (z angl. forkhead box proteins)
G6PD	(z angl. glucose-6-phosphate dehydrogenase)
GDC-0941	inhibitor PI3K
GDP/GTP	guanosindifosfát/guanosintrifosfát
GLUT1/4	glukosový transportér (z angl. glucose transporter)
GSK-3 β	serin-threoninová kinasa (z angl. glycogen synthase kinase 3 β)
CHAPS	detergent ((3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát))

KIBRA	(z angl. kidney and brain expressed protein)
LATS1/2	serin-threoninové kinasy (z angl. large tumor suppressor)
LRP5/6	transmembránový receptor (z angl. low-density lipoprotein receptor-related protein)
MAPK	protien kisasa (z angl. mitogen activated protien kinase)
MDM2	ubikvitin ligasa (z angl. mouse double minute 2 homolog)
MEK1/2	serin-threoninové kinasy
MKK3/6	proteinové kinasy
MLC-1	anti-apoptický protein rodiny Blc-2
MLKs	(z angl. mixed-lineage kinase)
MOB1A/B	enzym (z angl. MOB kinase aktivator 1A/B)
MOMP	permeabilizace vnější mitochondriální membrány (z angl. mitochondrial outer membrane permeabilization)
MST1/2	proteinové kinasy součástí Hippo dráhy (z angl. mammalian STE20-like protein kinase)
mTOR	serin-threoninová kinasa (z angl. mammalian target of rapamycin)
mTORC1	proteinový komplex součástí mTOR (z angl. mTOR Complex 1)
mTORC2	proteinový komplex součástí mTOR (z angl. mTOR Complex 2)
NF2	tumor-supresorový protein (z angl. neurofibromin 2)
NOXA	pro-apoptický protein z rodiny Blc-2
P53	protein o velikosti 53 kDa
p85	regulační podjednotka
p110	katalytická podjednotka

P13KC2 $\alpha/\beta/\gamma$	enzymy náležící do II. třídy PI3K
PARKIN	protein součástí E3 ubikvitin ligasy
PBS	fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)
PDPK1	protein kinasa (z angl. phosphoinositide-dependent protein kinase 1)
PDZ	vazebná doména obsahující 80-90 aminokyselin
PHD	proteinová doména (z angl. pleckstrin homology domain)
PI3K	enzym ze skupiny kinas (z angl. phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase)
PIP2	fosfolipid (z angl. phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphate)
PIP3	fosfolipid (z angl. phosphatidyl-inositol (3,4,5)-triphosphate)
PKC α	protein kinasa
PP2A	serin-threoninová fosfatasa (z angl. protein phosphatase 2)
PTEN	(z angl. phosphatase and tensin homolog)
Raf	rodina patřící mezi serin-threoninové kinasy (z angl. rapidly accelerated fibrosarcoma)
Ras	protein mající významnou roli v buněčné signalizaci (z angl. rat sarcoma)
RIPA	pufr pro radioimunoprecipitační esej (z angl. radio-immunoprecipitation assay)
RTK	tyrosinkinasový receptor (z angl. receptor tyrosine kinase)
SAV1	adaptorový protein Hippo dráhy (z angl. Salvador homologue 1)
SCO2	gen pro cytochrom c oxidasu (z angl. synthesis of cytochrome c oxidase 2)
SDS	dodecylsírany amonný
SGK1	serin-threoninová kinasa

SMAC	mitochondriální protein (z angl. second mitochondria-derived aktivator of caspases)
SMADs	intracelulární proteiny převádějící extracelulární signály do jádra
SOS	(z angl. son of sevenless)
TAK-1	protein kinasa
TCF	transkripční faktory podílející se na průběhu Wnt signální dráhy
TEADs	transkripční faktor (z angl. trascriptional enhancer factors)
TEMED	N,N,N',N-Tetramethylethylendiamin
TNF	faktor způsobující nekrosu nádorů (z angl. tumor necrosis factor), signální protein náležící mezi cytokiny uplatňující se především v imunitní odpovědi
TP53	gen kódující protein P53 (z angl. tumor protein P53)
TRADD	(z angl. Tumor necrosis factor receptor type 1- associated Death domain protein)
TRAIL	protein náležící do TNF rodiny proteinů (z angl. TNF-releated apoptosis- inducing lingand)
Tris	tris(hexomethyl)aminomethan
TTBS	(z angl. Tris buffered saline with Tween)
VpS34	protein podobný PI3K
WILLIN	protein součástí Hippo dráhy
Wnt dráha	konservovaná signalizační kaskáda
YAP/TAZ	onkoproteiny Hippo dráhy
Z-DEVD	inhibitor kaspas

1. Úvod

Rakovina patří k nejvíce obávanému onemocnění a spolu s onemocněním cév a srdce způsobuje vysoké procento úmrtí v České republice. Každý rok podlehně zhoubnému nádorovému onemocnění více jak 27 000 osob [1]. Existuje mnoho typů nádorového onemocnění, mezi které patří mimo jiné i rakovina slinivky, tlustého střeva, prsu či žaludku.

Leukémie patří mezi nejčastější dětské onemocnění, které se vyskytuje ve třetině případů ze všech nádorových onemocnění. V České republice je u dětí ročně diagnostikováno 80 nových případů výskytu tohoto onemocnění [2]. Leukémie je onemocnění bílých krvinek, jež se projevuje zmnožením určitého typu lymfocytů v kostní dřeni nebo v krvi. V lidském organismu jsou zmnožené lymfocyty charakteristické abnormální funkcí, utlačují zdravé krvetvorné buňky a navíc ztrácí svou přirozenou obranyschopnost. Leukemii rozdělujeme dle patologicky změněných buněk na lymfatickou a myeloidní a dále podle průběhu onemocnění na akutní a chronickou [3]. Příčinou onemocnění může být špatná životospráva, genetické poruchy, vliv životního prostředí, stres či kouření.

V dnešní době je leukémie u řady pacientů vyléčitelná, záleží však na jejím typu a včasné diagnostice [4]. Každý pacient má průběh léčby nepatrně odlišný. V posledních letech došlo k velkému pokroku v léčbě tohoto onemocnění. Nyní se vědci zabývají výzkumem, který by mohl zásadně ovlivnit léčbu T-buněk pomocí monoklonální protilátky. Ta se naváže na receptor přítomný na povrchu leukemické T-buňky a na další buňku imunitního systému, čímž dojde ke zničení nádorové buňky [5].

1.2. Buněčná signalizace

Buněčná signalizace je proces, kterým buňka komunikuje s okolními buňkami a reaguje na podněty svého okolí. Reguluje vývoj, proliferaci a diferenciaci buněk, dále je zodpovědná za řízení buněčných pochodů, jako jsou například metabolismus, sekrece látek a organizace buněčné smrti [6]. Buněčná signalizace se dělí na signalizaci vnitrobuněčnou a mezibuněčnou. Buňka produkuje do svého okolí signální molekuly, které jsou rozpoznány receptory na povrchu cílové buňky. Tato buňka následně převádí signál prostřednictvím vnitřní signalizační kaskády, jejímž konečným produktem je odpověď buňky na signál. Signální molekulou nejčastěji bývá hormon, jehož sekrece je přísně řízena stimuly.

1.2.1. Mezibuněčná signalizace

Při mezibuněčné signalizaci buňky v organismu spolu navzájem komunikují na různou vzdálenost. Podle toho, jakou dráhu musí hormony urazit k cílové buňce, můžeme signalizaci rozdělit na čtyři typy.

1.2.1.1. Endokrinní signalizace

Hormony jsou produkovány ve specializované tkáni a exocytosou transportovány do krve. Oběhový systém distribuuje hormony po celém těle a zajišťuje jejich přítomnost i v periferních tkáních organismu [7]. Odezvu na signál může způsobit pouze taková cílová tkáň, která má na svém povrchu receptor pro konkrétní hormon.

1.2.1.2. Parakrinní signalizace

Signály, které působí lokálně mezi sousedními buňkami, se nazývají parakrinní. Hormon dosáhne cílové buňky pasivní difusí. Jelikož působení hormonů je pouze lokální, používá se pro ně označení tkáňové hormony nebo lokální mediátory. Tento typ signálu vyvolává rychlé reakce, které trvají v řádech několika sekund, jelikož tkáňové hormony jsou rychle odstraňovány enzymy nebo přemístěny sousedními buňkami [7]. Příkladem tohoto typu signálu je synapse mezi nervovými buňkami.

1.2.1.3. Autokrinní signalizace

Autokrinní signalizace je zvláštním druhem signalizace parakrinní. Signální molekuly ovlivňují buňku, která tyto molekuly produkuje nebo stejné buňky v okolí.

Autokrinní i parakrinní typ signalizace se významně uplatňuje při buněčné diferenciaci během časného stádia ontogeneze [8].

1.2.1.4. Juxtakrinní signalizace

Jedná se o typ signalizace, kdy buňka má signální molekulu navázanou na svém povrchu a dotykem ovlivňuje buňku cílovou. Sousední buňky jsou propojeny pomocí proteinů a membránových receptorů [8].

1.2.2. Vnitrobuněčná signalizace

Vnitrobuněčná signalizace probíhá v rámci jedné buňky systémem signálních drah. Signální dráhy se též označují jako signální kaskády a umožňují buňce reagovat na přijatý signál. Signální dráhy jsou zapojeny do mnoha buněčných procesů zahrnující například proliferaci, metabolismus či apoptosu buněk.

1.2.2.1. Wnt signalizace

Název této dráhy vznikl fúzí dvou jmen. Prvním je polární gen bezkřídlých druhu *Drosophila* (z angl. wingless) a druhým je homologní obratlovec (z angl. integrated nebo int.) [9]. Wnt signalizace ovlivňuje celou řadu procesů, které jsou nezbytné pro vývoj a udržení stabilního prostředí organismu. Mutace Wnt signální dráhy mohou vést k závažným onemocněním a způsobit například rakovinu střeva či jiné tkáně [10]. Ligandem Wnt dráhy jsou glykoproteiny bohaté na cystein o sekvenci 350 – 400 aminokyselin, která je součástí N-terminálního signálního peptidu [11]. Wnt signální dráha je tvořena několika drahami, které dělíme následovně:

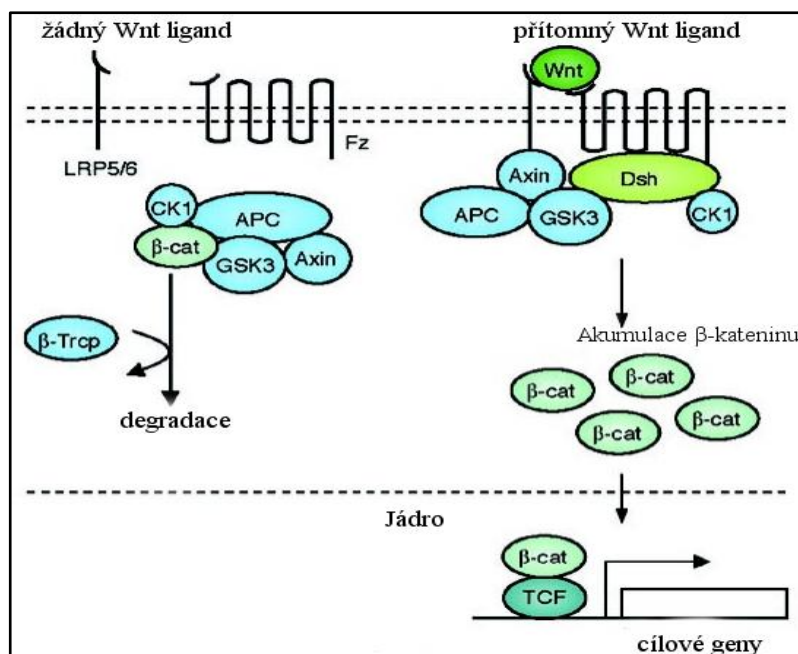
- a) kanonická signální dráha závislá na β -kateninu
- b) nekanonická dráha nezávislá na β -kateninu, kam patří planární buněčná polarita (PCP)
- c) Wnt/ Ca^{2+}

Dále se práce bude zabývat pouze kanonickou signální dráhou, jelikož je doposud nejvíce prozkoumána [10]. Receptorem je protein z rodiny Frizzled. Jedná se o sedmkrát transmembránový protein. Všechny receptory z této rodiny mají extracelulární doménu obsahující motiv složený z cysteinových zbytků tzv. CRD (z angl. cystein rich domains).

Wnt kanonická signální dráha je aktivována vazbou Wnt ligandu na receptor přes CRD oblast N-koncové části [10, 12].

Pro přenos signálu je důležitý ko-receptor LRP5/6 (z angl. low-density lipoprotein receptor-related protein), který vytváří komplex s Wnt ligandem a receptorem. Po vytvoření komplexu a translokaci proteinů Dishevelled (Dvl) dochází k interakci Dvl s Axinem. Axin se společně s proteiny GSK-3 β (z angl. glycogen synthase kinase 3 β), CK1 γ (z angl. casein kinase) a PP2A (z angl. protein phosphatase 2A) translokuje do membrány. GSK-3 β a CK1 γ způsobí fosforylaci LRP5/6 [13]. Tyto proteiny vedou k cytoplazmatické stabilizaci transkripčního modulátoru β -kateninu [14] tak, že degradují destrukční komplex zahrnující protein Axin, nádorový supresor APC (z angl. adenomatous polyposis coli), GSK-3 β a CK1 α a tím dochází k akumulaci β -kateninu v cytoplasmě [15]. β -katenin je translokován do jádra, kde se váže na DNA-vazebný transkripční faktor TCF (z angl. transcription factors) a reguluje transkripci cílových genů.

V případě, že nedochází k aktivaci Wnt signální dráhy interakcí Wnt ligandu s receptorem, dochází k fosforylaci molekul β -kateninu prostřednictvím destrukčního komplexu. GSK-3 β a CK1 γ v tomto případě fosforylují β -katenin, který je následně rozpoznán ubikvitin ligasovým komplexem, jehož součástí je protein β -TrCP. Tímto mechanismem je β -katenin ubikvitinován a určen k rychlé degradaci v proteasomu [10]. Průběh kanonické dráhy je zobrazen na obr. 1 na straně 17.



Obr. 1 – Průběh kanonické dráhy. V levé části obrázku není přítomný Wnt ligand, dochází proto k fosforylaci a ubiquitinaci β -kateninu a následně k jeho degradaci proteasomem. V pravé části vidíme interakci Wnt ligandu s receptorem, dochází k fosforylaci LRP5/6 a degradaci destrukčního komplexu. V tomto případě není β -katenin fosforylován, dochází k jeho akumulaci v cytoplasmě a translokaci do jádra, kde se váže na transkripční faktor TCF. Převzato a upraveno z [13].

1.2.2.2. Ras–Raf –MEK–ERK signalizace

Ras–Raf–MEK–ERK (z angl. extracellular-signal-regulated kinase) dráha je rovněž označována jako ERK. ERK je prvotní signalizační systém existující ve všech eukaryotech. Kontroluje a reguluje zásadní buněčné procesy, mezi které patří proliferace, diferenciace, transformace, regulace buněčného cyklu a apoptosa [15]. Tato signální dráha je aktivována působením růstových faktorů, širokou škálou hormonů nebo cytokinů.

Ras je malý protein vyskytující se ve čtyřech isoformách: H–Ras, N–Ras, K–Ras 4a a 4b. K aktivaci Ras dochází navázáním ligandu na receptor EGFR (z angl. epidermal growth factor receptor) [16]. Ras patří mezi G-proteiny vykazující GTPasovou aktivitu. Pokud je na protein vázáno GDP, Ras je v neaktivním stavu. Naopak váže-li GTP, aktivuje se, čímž spustí kaskádu reakcí. K aktivaci napomáhá SOS (z angl. son of sevenless), který indukuje výměnu GDP za GTP. Aktivovaný Ras protein se váže s vysokou afinitou na Raf kinasu patřící do serin-threoninových kinas a způsobuje její aktivaci a translokaci do

buněčné membrány. Raf kinasa patří mezi MAP kinasy (MAPKKK) a u savců se vyskytuje ve třech isoformách: A-Raf, B-Raf a C-Raf, neboli Raf-1 [17]. Raf dále aktivuje obě serin-threoninové kinasy MEK1 a MEK2 fosforylací serinových zbytků. Následně aktivní MEK1/2 fosforyluje v aktivační smyčce motiv Thr – Glu – Tyr– a takto aktivuje ERK1 a ERK2 serin-threoninové kinasy. Fosforylovaný ERK je schopný translokace do jádra a zde reguluje expresi genů prostřednictvím aktivace a fosforylace transkripčních faktorů [18].

Ras mutace se nacházejí až u 30 % všech nádorů a jsou běžné především u karcinomu pankreatu a tlustého střeva. B-Raf mutace se vyskytují zřídka a jsou zodpovědné především za rakovinu štítné žlázy a vaječníků [19]. Nedávné studie ukázaly, že ERK1/2 a jejich efektory MEK1/2 jsou aktivovány v akutní myeloidní leukémii. Navíc Ras–Raf–MEK–ERK dráha podporuje růst a zabraňuje buněčné smrti krvetvorných buněk [20].

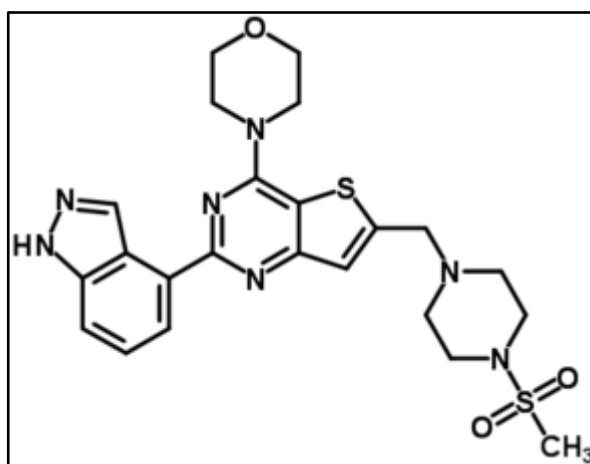
1.2.2.3. PI3K–AKT–mTOR signalizace

PI3K–AKT–mTOR signální dráha je aktivována u mnoha typů rakoviny mutací PI3K (z angl. phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase), AKT, expozicí karcinogenů nebo zvýšenou expresí receptorů EGFR. Tato cesta je zapojena do mnoha procesů podílejících se na proliferaci, růstu, metabolismu a přežití buněk.

PI3K patří do rodiny enzymů, která fosforyluje 3'–OH konec inositolového kruhu fosfatidylinositolu. Rodina PI3K obsahuje 15 různých enzymů, které jsou rozděleny do tří tříd podle jejich funkce: I., II. a III. třída. I. třídu tvoří heterodimery složené z katalytické p110 a regulační podjednotky p85, kterou lze dále rozdělit na podskupiny IA a IB. Druhou třídu rodiny PI3K tvoří členové P13KC2 α , P13KC2 β a P13KC2 γ , zatímco třetí třída je tvořena jedním členem kódovaným genem *VpS34*. Aktivní katalytická podjednotka p110 α katalyzuje produkci PIP3 (z angl. phosphatidyl-inositol (3,4,5)-triphosphate) fosforylací PIP2 (z angl. phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphate) [21, 22]. PIP3 je důležitým druhým poslem, jehož aktivita je regulována prostřednictvím PTEN (z angl. phosphatase and tensin homolog) [23]. Fosforylovaný PIP3 poskytuje několik vazebných míst pro různé komponenty, včetně PDPK1 (z angl. phosphoinositide-dependent protein kinase 1) a AKT (označovaný také jako proteinkinasa B), jež patří do serin-threoninových kinas. AKT kinasa se vyskytuje ve třech isoformách: AKT1, AKT2 a AKT3. AKT je posledním efektem a v buňce koordinuje metabolismus glukosy a umožňuje buňce neomezenou

proliferaci, která je jednou z charakteristik maligního fenotypu [24]. V membráně je AKT aktivováno vazbou PHD (z angl. pleckstrin homology domain) na PIP3 a následnou fosforylací threoninu 308 a serinu 473 v C-terminální části [25]. V dalším kroku AKT aktivuje mTOR (z angl. mammalian target of rapamycin). mTOR je serin-threoninová kinasa složená ze dvou odlišných podjednotek mTORC1 (z angl. mTOR complex) a mTORC2. Každý z komplexů je lokalizován v odlišném buněčném kompartmentu, což ovlivňuje jejich aktivaci a funkci. mTORC1 integruje vstupy z nejméně pěti hlavních intracelulárních a extracelulárních podnětů a podle nich kontroluje mnoho nezbytných procesů včetně syntézy proteinů a lipidů. Mezi hlavní podněty patří hladina kyslíku, stres, růstové faktory a aminokyseliny. Druhý multiproteinový komplex mTORC2 není tak důkladně prozkoumán, je však zřejmé, že je zodpovědný za regulaci dynamiky cytoskeletu aktivací protein kinázy PKC α a pomocí fosforylace serin-threoninové kinasy SGK1 kontroluje transport iontů [26, 27].

Objev a vývoj cílených inhibitorů kinas přináší nové terapeutické možnosti z důvodu vysokého podílu výskytu rakoviny s onkogenními abnormalitami v PI3K dráze. PI3K dráha je atraktivním terapeutickým cílem při léčbě rakoviny a byla vyvinuta celá řada jejích inhibitorů cílících tuto onkogenní dráhu na různých úrovních [28]. Jedním z účinných specifických inhibitorů PI3K a mTOR je GDC-0941. GDC-0941 vede k zastavení buněčného cyklu a v nádorových buněčných liniích vyvolává indukovanou apoptosu. V současné době je inhibitor zkoumán v klinických studiích pro léčbu rakoviny [29]. Struktura GDC-0941 je znázorněna na obr. 2 na straně 20.



Obr. 2 – Struktura GDC-0941. Převzato a upraveno z [30].

1.2.2.4. P53 signalizace

Gen TP53 (z angl. tumor protein P53) náleží mezi supresorové geny kódující tvorbu proteinu P53. P53 se rovněž nazývá strážce genomu, jelikož jeho primární funkcí je rozpoznávání poškozené genetické informace. Jedná se o jaderný fosfoprotein, který je regulován skrz post - translační modifikace [31]. Lidský P53 má 23 různých fosforylačních a defosforylačních míst a je složený z 393 aminokyselin a 4 podjednotek: transkripční N-terminální doména, doména bohatá na prolin, DNA vázající a C-terminální doména. Uvádí se, že téměř za 50 % veškerých nádorových onemocnění je zodpovědná mutace P53. Tumor supresorový protein je aktivován odpovědí na stresové signály, což vede k inhibici růstu nádorových buněk, a to buď prostřednictvím zástavy buněčného cyklu, nebo indukci apoptosy, čímž se zabrání rozvoji nádoru [32, 33].

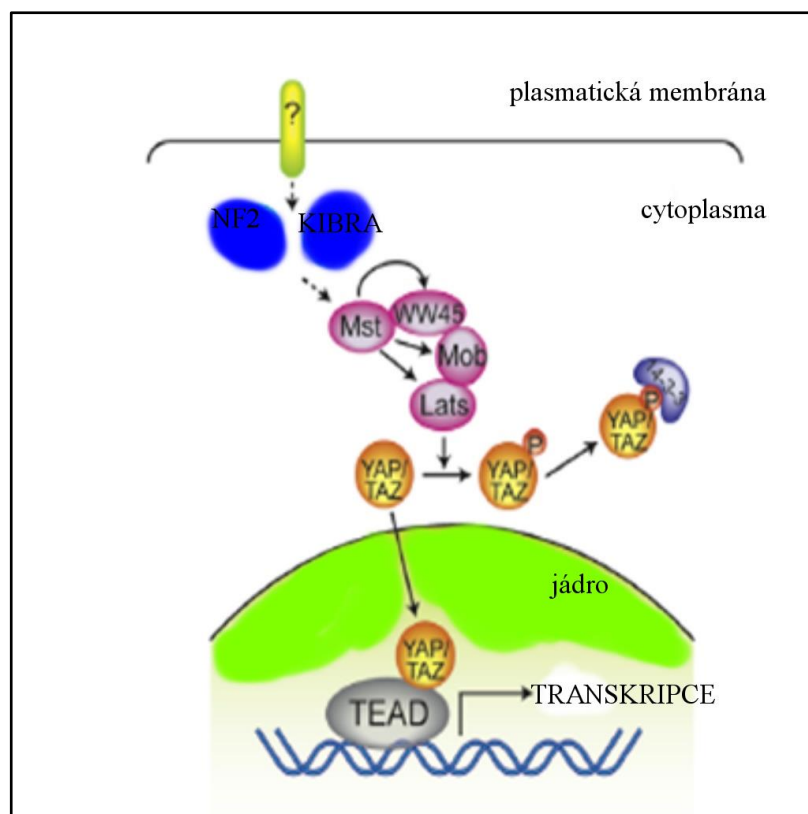
Jedním z hlavních regulátorů funkce P53 je protein MDM2, který inhibuje aktivitu tumor supresorového proteinu několika způsoby: vazbou k transkripční doméně proteinu, acylací P53 a označením proteinu k ubikvitinaci [33]. Mnoho stresových signálů reguluje činnost P53 a MDM2 prostřednictvím indukce kinas. Při poškození DNA je jednou z kinas ATM (z angl. ataxiatelangiectasia mutated protein) náležící společně s ATR (z angl. ATM-Rad3-related) do rodiny PI3K příbuzných kinas. ATM fosforyluje P53 na několika místech zahrnující serin 9, 15, 20, 46, zatímco ATR fosforyluje serin 15 a 37 a zvyšuje transkripční aktivitu P53 proteinu [31, 34]. Na druhou stranu, stresové stimuly mohou vést k aktivaci kinas MLKs, TAK-1 a ASK-1, které následně aktivují kinasy MKK3 a MKK6, jež aktivují fosforylací P38 [35]. Aktivní P38 fosforyluje velké množství substrátů vedoucí k rozdílným buněčným odpovědím. Mnohé studie potvrdily, že P38 má důležitou roli v aktivaci P53.

Dále byla popsána úloha P53 v regulaci buněčného metabolismu. P53 může ovlivňovat metabolismus několika způsoby. Inhibuje pentosa-fosfátový cyklus prostřednictvím vazby proteinu P53 na G6PD (z angl. glucose-6-phosphate dehydrogenase). G6PD je limitujícím enzymem v pentosa-fosfátovém cyklu a pro jeho funkci je nezbytný [36]. P53 také transkripčně potlačuje expresi GLUT1 (z angl. glucose transporter) a GLUT4. Tímto způsobem snižuje příjem glukosy do buněk, čímž potlačuje anaerobní glykolýzu. Tento protein je dále zodpovědný za udržení integrity mitochondrií a za zvýšení mitochondriální oxidativní fosforylace prostřednictvím exprese cílových genů, mezi které především patří SCO2 (z angl. synthesis of cytochrome c oxidase 2), PARKIN a

AIF. Důležitou roli hraje i v udržování homeostasy buněčného metabolismu. Všechny tyto aspekty společně přispívají k potlačení nádorů [37, 38].

1.2.2.5. Hippo signalizace

Hippo signální dráha je evolučně zachovaný systém od kvasinek až po savce. Její součástí je u savců nejméně 35 proteinů, které ovlivňují růst tkání a orgánů během vývoje organismu a také se podílejí na průběhu patologických procesů. Hlavní část signální dráhy zahrnuje kinasové jádro složené z páru serin-threoninových kinas, MST1 (z angl. mammalian STE20-like protein kinase 1), MST2, dále LATS1 (z angl. large tumor suppressor 1) a LATS2. Všechny tyto proteiny spolu s adaptorovými proteiny, kam patří SAV1 (z angl. Salvador homologue 1), MOB1A (z angl. MOB kinase activator 1A) a MOB1B inhibují tkáňový růst prostřednictvím fosforylace LATS1/2 kinas a následné fosforylace cílových onkoproteinů YAP (z angl. YES-associated protein) a transkripčního ko-aktivátoru TAZ s PDZ vazebnou doménou [39]. Aktivace Hippo dráhy způsobí fosforylaci onkoproteinů umožňující vazbu proteinu 14-3-3, který způsobí akumulaci YAP a TAZ v cytoplasmě nebo stimuluje jejich proteasomální degradaci. Pokud je Hippo dráha inaktivní, fosforylace onkoproteinů je potlačena, dochází k jejich translokaci do jádra, kde regulují aktivitu transkripčních faktorů TEADs (z angl. transcriptional enhancer factors) a SMADs, a tím pozitivně ovlivňují proliferaci [40]. Hippo dráha je aktivována působením signalizačních větví, které zahrnují několik komponentů. Prvním je KIBRA (z angl. kidney and brain expressed protein), dále pak WILLIN a NF2 (z angl. neurofibromin 2). Jednotlivé komponenty Hippo signální dráhy jsou zobrazeny na obr. 3 na straně 22.



Obr. 3 – Jednotlivé komponenty Hippo dráhy u savců. Otazníky značí neznámé molekuly a přerušované čáry neznámé molekulární mechanismy. Na obrázku je vidět, že v případě, kdy je dráha aktivní, kaskádou dějů dochází k fosforylaci onkoproteinů TAZ a YAP a jejich následné degradaci. Když je dráha inaktivní, k fosforylaci nedochází, onkoproteiny se váží na transkripční faktory a buňka neomezeně proliferuje. Převzato a upraveno z [41].

Ačkoli mutace u Hippo dráhy nejsou obvyklé, její aktivita je značně ovlivněna na úrovni TAZ a YAP onkoproteinů působením signálních drah s onkogenní mutací. Nejvýznamnější interakce s Hippo dráhou vykazuje Wnt a Notch signalizace, dále pak signalizace spojená s mTOR [39]. Bylo dokázáno, že Hippo/MST1 kinasa přímo fosforyluje a aktivuje protein FOXO (z angl. forkhead box proteins), který působením stresových stimulů způsobuje expresi proapoptických genů, mezi které mimo jiné patří BIM, FASL a TRAIL [42].

1.2.2.6. Receptorová signalizace

Receptory se vyskytují na membráně cílové buňky, váží na svůj povrch signální molekuly, a tak zprostředkovávají spojení mezi extracelulárním a intracelulárním buněčným prostorem [43]. Jestliže se signální molekula naváže na receptor na povrchu buňky, receptor se aktivuje a nastartuje přenos buněčných signálů. Jedná se o kaskádu

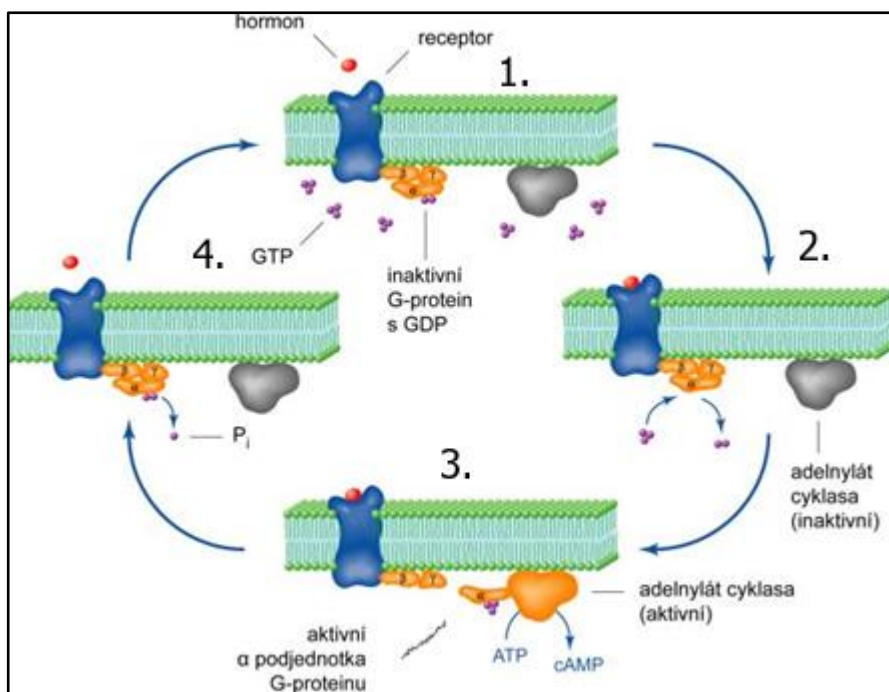
molekulárních dějů, které zesilují přijatý signál a šíří jej k cílovým molekulám, kterými jsou nejčastěji regulační proteiny zodpovědné za expresi specifického genu a enzymy. Ty jsou součástí metabolických pochodů [43].

1.2.2.6.1. Receptory spřažené s iontovými kanály

Signalizace je zprostředkována prostřednictvím neurotransmiterů, které přechodně otevírají, nebo zavírají iontové kanály [44]. Nejčastěji se vyskytuje mezi neuronem a jinou nervovou buňkou nebo buňkou svalovou. Iontové kanály jsou tvořeny proteinem, po navázání neurotransmiteru na vazebné místo dojde k jeho otevření. Iontové kanály jsou vysoce selektivní a propouští pouze určitý typ iontu.

1.2.2.6.2. Receptory spřažené s G – proteiny

G – proteiny se skládají ze tří podjednotek α , β , a γ a patří do skupiny GTP-hydrolas, které hydrolyzují GTP (z angl. guanosine-5'-triphosphate) na GDP (z angl. guanosine-5'-diphosphate). G-protein může nabývat dvou stavů. Jedním je stav aktivní, kdy je na něj vázáno GTP. Ve stavu neaktivním je naopak na protein vázáno GDP. Nejprve se na vazebné místo proteinu naváže specifický ligand, kterým může být hormon, růstový faktor, neurotransmitter nebo glykoprotein [45]. Po navázání ligandu na receptor dojde ke spojení receptoru s G – proteinem, na kterém je na α podjednotce navázané GDP, které je vyměněno za GTP, jehož koncentrace v okolí je vyšší než koncentrace GDP. Tato výměna způsobí disociaci α podjednotky s navázaným GTP od zbylých podjednotek β a γ G-proteinu [46]. Následně se α podjednotka naváže na další enzym signální kaskády, kterým je nejčastěji fosfolipáza C nebo adenylátcyklasa. Vazbou dochází k aktivaci enzymu, k produkci a k syntéze druhého posla. α podjednotka má GTPasovou aktivitu, rychle štěpí fosfát z GTP, všechny podjednotky se opět spojí, čímž ukončí buněčnou odpověď a protein se vrací zpět do svého neaktivního stavu a celý cyklus se uzavírá [47]. Cyklus je znázorněn na obr. 4 na straně 24.



Obr. 4 – Cyklus G – proteinu spřaženého s receptorem. Oranžové ovály znázorňují tři podjednotky tvořící G-protein. V první fázi je G-protein neaktivní, v tomto stavu je na α podjednotku vázáno GDP. Po interakci hormonu s receptorem dochází k výměně GDP za GTP a k disociaci této podjednotky od zbylého komplexu podjednotek β a γ . Vazbou α podjednotky na cílovou molekulu, v našem případě adenylylacyklasu, dochází k její aktivaci a produkuje za spotřeby energie cyklický adenosinmonofosfát. GTP vázané na α podjednotce se rychle zpět hydrolyzuje, tím se protein dostává zpět do svého neaktivního stavu. Převzato a upraveno z [48].

1.2.2.6.3. Receptory spřažené s enzymem

Mezi tento druh receptorů patří především tyrosinkinasový receptor označovaný jako RTK (z angl. receptor tyrosine kinase). RTK se skládají z extracelulární N-terminální části obsahující vazebnou doménou, z jednoduchého transmembránového α helixu a z cytosolické C-terminální domény s protein-tyrosinkinasovou aktivitou. Po navázání růstového faktoru na vazebná místa extracelulární části receptorů dochází k dimerizaci se sousedním receptorem stejného druhu [49, 50]. Dimerizace aktivuje enzym tyrosinkinasu, který katalyzuje přenos fosfátové skupiny z ATP (z angl. adenosine triphosphate) na molekuly tyrosinu. Tímto způsobem se receptor fosforyluje, což způsobí jeho celkovou aktivaci. Aktivní fosforylovaný receptor je rozpoznáván mnoha proteiny, z nichž každý může vyvolat buněčnou odpověď.

1.3. Apoptosa

Apoptosa je jedním z mechanismů programované buněčné smrti vyskytující se především u mnohobuněčných organismů. Apoptosa vede k usmrcení a snížení počtu buněk, které jsou poškozené, nebo pro organismus nepotřebné. Je charakterizována morfologickými rysy zahrnující smrštění buňky, kondenzaci a fragmentaci jádra i chromosomů, poškození a změnu tvaru membrány. Zbytky buněk jsou fagocytovány a odstraněny, nedochází ke vzniku zánětu jako v případě nekrosy [51]. Apoptosu aktivují dvě dráhy, vnější a vnitřní. Průběh obou drah vedoucích k apoptose je znázorněn na obr. 5 na straně 27.

1.3.1. Vnější dráha

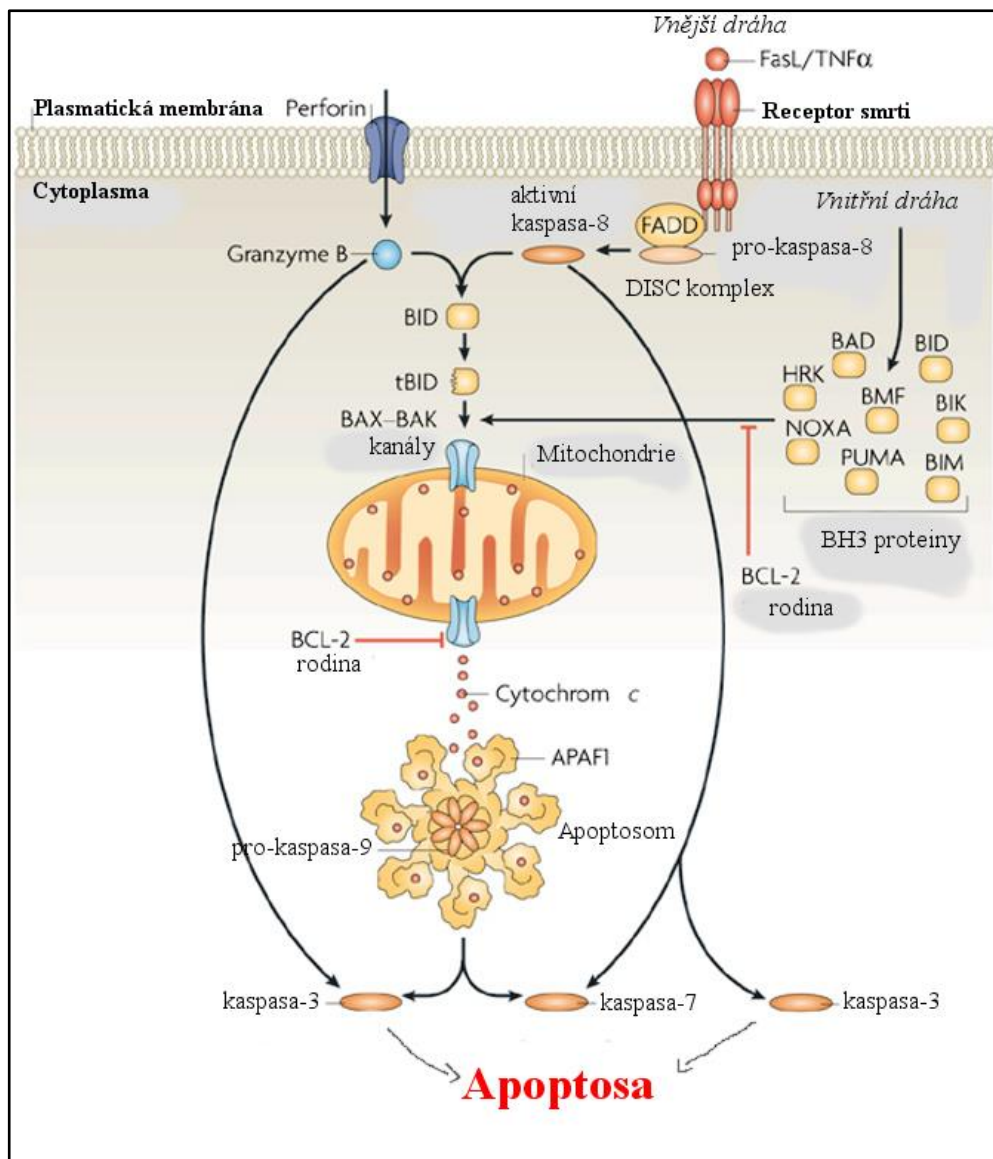
Ligandy smrti patří do rodiny TNF (z angl. tumor necrosis factor) a aktivují vnější apoptickou dráhu vazbou na pro-apoptické receptory přítomné na buněčné membráně. Kromě ligandů smrti náleží do TNF rodiny další významné ligandy produkované buňkami imunitního systému, mezi které patří TNF, Fas a TRAIL (z angl. TNF-related apoptosis-inducing ligand). Fas ligandy mají velké uplatnění především v imunitním systému, jelikož se nachází na povrchu cytotoxických T-lymfocytů, kde mohou způsobit apoptosu. Vazba ligandu na receptor způsobí jeho trimerizaci a navázání FADD nebo TRADD. Poté se naváže prokaspasa-8, nebo -10 a dojde k vytvoření komplexu DISC (z angl. death-inducing signaling complex). Ve vytvořeném komplexu se kaspasy aktivují a aktivovaná kaspasa-8 dále aktivuje kaspasu-3. Kaspasa-3 způsobuje apoptosu, nebo štěpí BID (z angl. BH3 interacting-domain death agonist), který se dále uplatňuje v průběhu vnitřní apoptické dráhy [52, 53].

1.3.2. Vnitřní dráha

Vnitřní dráha je aktivována působením mnoha stresových faktorů, včetně poškození DNA, oxidačního stresu, zvýšené koncentrace cytosolických vápenatých iontů a hromadění nesbalených proteinů v endoplasmatickém retikulu [54]. Existuje mnoho signálních drah zodpovědných za iniciaci apoptosy, které finálně ovlivňují základní funkce mitochondrie a způsobují permeabilizaci její vnější membrány, taktéž označovanou MOMP (z angl. mitochondrial outer membrane permeabilization). Důsledkem je ztráta mitochondriálního transmembránového potenciálu, a tedy zastavení produkce ATP. Do

cytosolického prostoru se vylijí proteiny jako cytochrom c, AIF (z angl. apoptosis-inducing factor), endonukleasa G, DIABLO, jež je znám také pod názvem SMAC (z angl. second mitochondria-derived activator of caspases), které přispívají k aktivaci kaspas. Mezi nejdůležitější regulátory vnitřní dráhy patří proteiny z rodiny BCL-2. Z funkčního hlediska jsou děleny na pro-apoptické proteiny, kam náleží především BAX, BAK a BOK proteiny. Tyto proteiny zvyšují propustnost vnější mitochondriální membrány a tím podporují iniciaci apoptosy. Na druhou stranu skupina anti-apoptických proteinů, mezi které patří samotný protein BCL-2, BCL-xL, MCL-1 a mnoho dalších, inhibují funkci pro-apoptických proteinů [55].

Jakmile je z mitochondrie uvolněn cytochrom c, vytvoří vazbu s Apaf-1 a společně s dATP vyvolá tvorbu velkého komplexu nazývaného apoptosom. Apoptosom rekrutuje pro-kaspasu-9, uvolňuje aktivovanou kaspasu-9, jež dále aktivuje kaspasu-3. Následně kaspasa-3 spouští apoptosu [56].



Obr. 5 – Schéma vnitřní a vnější apoptické dráhy. Vnější dráha je aktivována vazbou ligandů smrti na příslušné receptory, vytvoří se komplex DISC. U vnitřní dráhy uvolněný cytochrom c s Apaf-1 vytváří apoptosom, díky kterému dojde k aktivaci kaspas. Pro obě dráhy je charakteristická finální aktivace kaspasy-3, která iniciuje apoptosu. Vnější dráha je spojena s dráhou vnitřní prostřednictvím BID proteinu, který je zodpovědný za uvolnění cytochromu c z mitochondrie. Převzato a upraveno z [57].

1.3.3. Vztah mezi apoptosou a Hippo/MST1 signalizací

Molekulární mechanismus aktivace MST1 je doposud neznámý. Je zřejmé, že podmínkou jeho aktivace je fosforylace a štěpení. V případě fosforylace se jedná o autokatalytický proces. Existuje několik hypotéz a článků, které aktivaci MST1 popisují. MST1 má dvě základní funkční domény. Jednou z nich je N-terminální kinasová doména a druhou C-terminální doména.

V reakci na apoptické stimuly dochází k odštěpení C-terminální domény MST1, N-terminální doména se hromadí v jádře, kde katalyzuje fosforylaci histonů, která způsobí kondenzaci chromatinu a indukci apoptosy [58]. Některé články popisují aktivaci MST1 štěpením efektorovými kaspasami-3 a -7 [59]. Před několika lety vyšla publikace, která se zabývá studiem MST1. Uvádí se, že působením α -TOS na buňky linie Jurkat aktivní MST1 fosforyluje FOXO1, který po přemístění do jádra aktivuje transkripci pro-apoptických genů jako je NOXA, který sledem reakcí vede k aktivaci kaspas. Tato teorie je v rozporu s předešlými teoriemi. Setkáváme se s jednou z prvních hypotéz, která nejprve popisuje aktivní MST1 a až následnou aktivaci kaspas [42]. V nedávné době byly publikovány další významné práce, které popisují aktivaci kaspas v závislosti na aktivitě MST1 proteinu. Aktivovaná MST1 oxidačním stresem způsobuje permeabilizaci vnější mitochondriální membrány a následnou aktivaci efektorových kaspas-3 a -7 [60, 61].

2. Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je určit úlohu v průběhu aktivace MST1 proteinu v nádorových buňkách. K tomuto účelu byla využita metoda tzv. elektropřenosu (z angl. blotting) proteinů z elektroforetického gelu na nitroceluloseovou membránu (nazývanou se Western blot), stanovení proteasové aktivity v buněčném lyzátu a metodu inhibice proteasové aktivity.

3. Materiál a metody

3.1. Přístroje a materiál

3.1.1. Biologický materiál

Leukemické T-buňky linie Jurkat

3.1.2. Přístroje a příslušenství

Aparatura na SDS elektroforézu: *BIORAD* (USA)

Aparatura pro přenos proteinů: *BIORAD* Trans-blot[®] SD Semi-dry transfer cell (USA)

Automatické pipety: *RAININ* Pipet-LITE XLS (USA, Kanada)

Bürkerova komůrka: *P-lab*

Centrifuga 5424R, *Eppendorf* (Německo)

Centrifuga ALC PK 110 (Itálie)

CO₂ inkubátor: *Panasonic*

Destičky: *Thermo Scientific*[®] BioLite 6 Well Multidish (USA)

TPP[®] Tissue culture Testplate 96F (Švýcarsko)

Elektrický zdroj: *BIORAD* PowerPac[™] HC (USA)

Filtrační papír: *BIORAD* Extra Thick Block Paper (USA)

Kamera: *BIORAD* ChemiDoc[™]MP Imaging Systém (USA)

Laminární box: *Juan* MSC 12 (Francie)

Nástavec na pipety: *Pipetus*[®] HIRCHMANN LABORGERATE (Evropa)

Nitrocelulosová membrána (póry 40μm): *SANTA Cruz Biotechnology* (USA)

Plastové špičky na automatické pipety: *RAININ* Precision Pipette Tips (USA)

Spektrofotometr: *BioTek* Synergy HT (USA)

Třepačka: *BIOER* Mixing Block MB-102 (Čína)

Váhy: *KERN*[®] EMB 600-2 (Německo)

Vortex: *Biosan* Vortex V-1 plus (USA)

3.1.3. Chemikálie

Akrylamid: *BIORAD*

APS (peroxodisíran amonný): *Sigma Aldrich*

BSA (hovězí sérový albumin): *Serva* Bovine serum

GDC-094: *Selleckchem*

DEVD: *SANTA Cruz Biotechnology*

DMSO (dimethylsulfoxid): *Sigma Aldrich*

Destilovaná voda, ethanol

Dithiothreitol: *Sigma Aldrich*

EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina): *Sigma Aldrich*

FBS (Fetální hovězí sérum): *Gibco* Fetal bovine serum

Hypotonický pufr (150 mM MgCl₂)

CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1- propansulfonát) hydrát: *Sigma Aldrich*

Kit na kvantifikaci proteinů: *Thermo SCIENTIFIC* Pierce[®] BCA Protein Assay kit

Kyselina kumarová: *Sigma Aldrich*

Luminol: *Sigma Aldrich*

Médium: *LONZA* BioWhittaker[®] RPMI 1640 s L-Glutamínem, FBS a ATB

Odtučněné sušené mléko: *BIORAD* Blotting-Grade Blocker

PBS pufr (0,15 M NaCl; 0,3 mM KCl; 1 mM Na₂HPO₄; 0,2 mM K₂HPO₄; pH 7,4): *Sigma Aldrich*

Primární protilátka: *Cell Signalling* MST1Rabbit monoclonal Ab IgG (USA)

SANTA Cruz Biotechnology Actin Goat polyclonal IgG (USA)

Pufr pro elektroforézu (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% SDS (w/v); pH 8,3):

BIORAD10 x TGS

Pufr pro měření kaspas (20 mM PIPES; 100 mM NaCl; 1mM EDTA; 0,1% CHAPS;

10% sacharosa; 10 mM dithiothreitol): Caspase Assay Buffer

Přenosový pufr (48 mM Tris; 39 mM Glycin; 20% methanol; pH 9,2): Transfer SEMI-

DRY Bjerrum Schafer-Nielsen Buffer

RIPA pufr s proteasovými a fosfatasovými inhibitory (150 mM NaCl; 1% NP-40;

0,5% deoxycholát sodný; 0,1% SDS; 50 mM Tris o pH 8,0)

Sacharosa: *Sigma Aldrich*

SDS (dodecylsírán sodný): *BIORAD*

Sekundární protilátka: *Santa Cruz Biotechnology* goat-anti-rabbit IgG – HRP (USA)

Santa Cruz Biotechnology rabbit-anti-goat IgG – HRP (USA)

Standard pro elektroforézu: *BIORAD* Precision Plus Protein Standards, All Blue

Substrát: *ThermoFisher Scientific* Super Signal West Femto Trial Kit

TEMED (tetramethylethyldiamin): *Sigma Aldrich*

Triton X-100: *Active Motif*

Tris (tris(hexomethyl)aminomethan) pufr (0,1M; pH 8,8)

TTBS pufr (50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,05% v/v Tween 20; pH 7.6)

Vzorkový pufr Leammli (2,4 ml 1M Tris o pH 6,8; 0,8 g SDS; 4 ml 100% glycerol; 0,01% bromfenolová modř; 1 ml merkptoethanolu; 2,8 ml vody)

3.2. Metody

3.2.1. Kultivace a pasážování buněk

Leukemické T-buňky linie Jurkat byly kultivovány v médiu RPMI 1640 obsahující glukosu, antibiotika, L-glutamin a fetální hovězí sérum, při teplotě 37° C, v atmosféře 5 % CO₂. Pasážování buněk probíhalo vždy v takovém časovém horizontu, aby buňky nepřesáhly koncentraci 900 000 buněk /ml.

3.2.2. Příprava celobuněčného lyzátu

Buňky byly pěstovány v kultivační láhvi v CO₂ inkubátoru při teplotě 37° C, v atmosféře 5 % CO₂. Buňky byly nasazeny tak, aby se v průběhu experimentu koncentrace buněk pohybovala v rozmezí 400 000 – 500 000 buněk/ml. Z kultivační láhve byl odebrán požadovaný počet buněk a následně byly centrifugovány 4 minuty při 400x g při pokojové teplotě (centrifuga ALC PK110). Následně byl pelet resuspendován v čerstvém médiu na výslednou koncentraci 500 000 buněk/ml a rozdělen po 2 ml do šesti-jamkových destiček. Ke 2 ml buněk bylo postupně přidáno GDC na výslednou koncentraci 10 µM. Jako kontrolní vzorky byly využity roztoky samotných buněk nebo buňky s odpovídajícím množstvím DMSO. Po dvouhodinové inkubaci v CO₂ inkubátoru byly buňky sklizeny, centrifugovány 4 min při 400x g a při pokojové teplotě (centrifuga ALC PK110). Následně byly pelety resuspendovány v 900 µl PBS pufru (0,15 M NaCl; 0,3 mM KCl; 1 mM Na₂HPO₄; 0,2 mM K₂HPO₄; pH 7,4). Poté byly jednotlivé suspenze opět centrifugovány 4 min při 400x g, při teplotě 4°C (centrifuga 5424R, Eppendorf). Ze všech stočených vzorků byl pipetou odsán supernatant a jednotlivé pelety buněk byly lyzovány v 50 µl RIPA pufru. Následně byly všechny vzorky obsahující RIPA pufr zvortexovány a po 20 minutovém stání na ledu stočeny při 14 000x g 10 minut (centrifuga 5424R, Eppendorf).

3.2.3. Příprava cytosolické frakce

Buňky byly pěstovány stejným způsobem jako v kapitole 5.2.2. ve čtyřech kultivačních lahvích. Každá lahev obsahovala 10 ml roztoku buněk a byla nasazena tak, aby v průběhu experimentu obsahovala 500 000 buněk/ml. Ke třem 10 ml roztokům buněk

bylo nejprve přidáno takové množství GDC, aby jeho výsledná koncentrace v roztocích byla 10 μM . Následně byl přidán do dvou lahví inhibitor Z-DEVD tak, aby výsledná koncentrace v jedné lahvi byla 2 μM a ve druhé 5 μM . Čtvrtá lahev obsahující pouze médium s buňkami byla využita jako kontrolní. Poté byly vzorky inkubovány 2 hodiny při teplotě 37°C v CO₂ inkubátoru. Po inkubaci byly roztoky buněk centrifugovány 4 min při 400x g a při pokojové teplotě (centrifuga ALC PK110). Pelet buněk byl resuspendován v 900 μl pufru PBS a centrifugován 4 min při 400x g při teplotě 4°C (centrifuga 5424R, Eppendorf). Supernatant byl odsán a ke každému ze čtyř vzorků bylo přidáno 200 μl hypotonického pufru (10x naředěný). Vzorky obsahující pufr byly 15 minut na ledu. Po uplynutí doby bylo přidáno 10 μl Tritonu X-100 a centrifugováno 0,5 min při 12 000x g (centrifuga 5424R, Eppendorf). Pro další stanovení byl využit získaný supernatant. Objemy a koncentrace přidávaných látek k jednotlivým roztokům buněk jsou znázorněny v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Objemy a koncentrace zásobních roztoků přidávaných k jednotlivým roztokům buněk v čerstvém médiu. V značí objem a c koncentraci.

vzorek	c zásobní /mM	V _{zásobního} / μl	RIPA/ Hyp. pufr
GDC	10	2,0	RIPA PI+FI
GDC	10	10,0	Hypotonický pufr
GDC + Z-DEVD 2μM	10	2,0	Hypotonický pufr
GDC + Z-DEVD 5μM	10	5,0	Hypotonický pufr

3.2.3. Kvantifikace proteinů

Ke stanovení koncentrace proteinů byl využit Pierce[®] BCA Protein Assay Kit. Tato metoda je založena na redukci mědnatého iontu proteinem v alkalickém prostředí a následnou chelatací mědného iontu kyselinou bicinchoninovou. Výsledkem je vznik barevného komplexu, který je stanovován spektrofotometricky při vlnové délce 562 nm.

Na mikrotitrační destičku byly naneseny 5x ředěné vzorky v RIPA pufru o objemu 5 μ l, nebo 2x ředěné v Hypotonickém pufru. Standardní vzorky byly rovněž nanášeny v objemu 5 μ l na destičku za použití roztoku BSA o koncentraci 2 000, 1 500, 1 000, 750, 500 a 250 μ g/ml. Ke všem vzorkům a standardům bylo přidáno 200 μ l činidla připraveného smíšením kyseliny bicinchoninové (BCA) a měďnatých iontů v poměru 50:1. Následně se všechny připravené vzorky nechaly stát 30 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci byla spektrofotometrem (Synergy HT) stanovena absorbance při vlnové délce 562 nm. Podle stanovené absorbance a kalibrační přímky standardních roztoků BSA byla stanovena koncentrace proteinů ve vzorcích.

3.2.4. SDS elektroforéza

Elektroforéza náleží mezi elektromigrační metody a umožňuje dělit látky na základě rozdílné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Pro dělení proteinů se nejčastěji využívá elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS). SDS udělí proteinu shodný záporný náboj a zajišťuje, že se proteiny dělí pouze podle své velikosti.

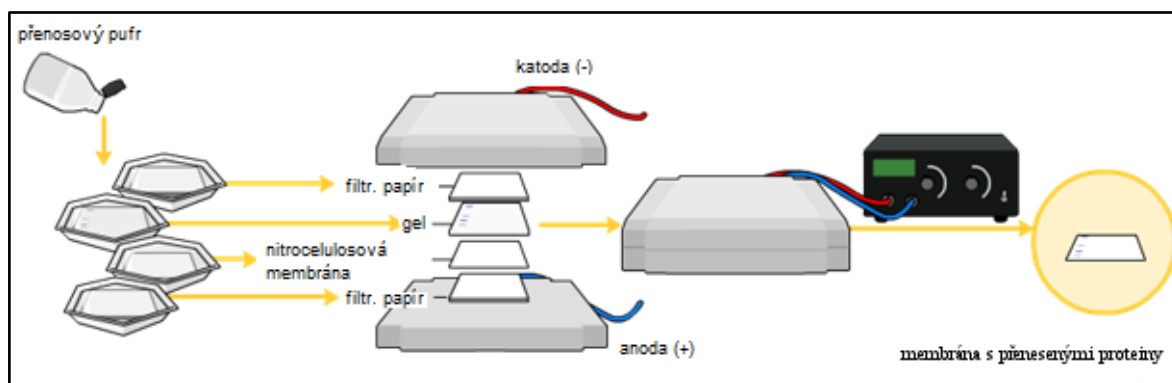
Pro průběh SDS elektroforézy byly připraveny dva gely: spodní, též označovaný jako dělicí gel (H_2O ; 30% akrylamid; 1,5 M Tris o pH 8.8; 10% APS a 10% SDS; TEMED), ve kterém dochází k dělení proteinů a vrchní, neboli zaostřovací gel (H_2O ; 30% akrylamid; 0,5 M Tris o pH 6.8; 10% APS a 10% SDS; TEMED), kde dochází k zaostření jednotlivých zón. Elektroforéza probíhala v aparatuře (aparatura Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra cell) vyplněné TGS pufrem (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% w/v SDS; pH 8.3) ředěném vodou v poměru 1:10. Vzorky byly ředěny RIPA pufrem, nebo hypotonickým pufrem tak, aby obsahovaly 40 μ g proteinu. K naředěným vzorkům byl přidán vzorkový pufr Leammli a byly zahřívány při teplotě 95° C po dobu 5 minut. Po vychladnutí se vzorky stočily 10 s při nízkých otáčkách (centrifuga 5424R, Eppendorf). Elektroforéza probíhala 20 min při napětí 100 V a 50 min při 150 V.

3.2.5. Přenos proteinů

Metoda tzv. přenosu (z angl. blotting) se využívá nejen pro přenos DNA (Southern blot), RNA (Northern blot), ale také pro přenos proteinů (Western blot). Rozdělené proteiny se po elektroforéze přenášejí z gelu na nitrocelulosovou membránu a

následně se vizualizují metodou tzv. imunodetekce prostřednictvím interakce primární a sekundární protilátky.

Přenos proteinů probíhal ve speciální aparatuře (Trans-blot® SD Semi-dry transfer cell). Do aparatury byl vložen filtrační papír, gel, membrána v uspořádání zobrazeném na obr. 6. Gel, membrána i filtrační papír byly před přenosem namočené v přenosovém pufru (48 mM Tris; 39 mM Glycin; 20% methanol; pH 9,2). Přenos probíhal 1 hodinu při konstantním napětí 15 V.



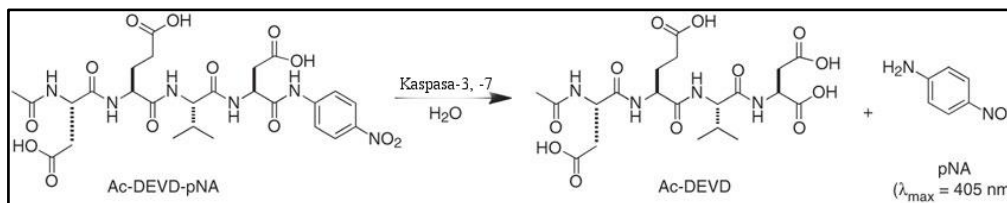
Obr. 6 – Schéma uspořádání aparatury pro přenos proteinů. Převzato a upraveno z [62].

Po přenosu proteinů byla membrána blokována na třepačce (Mixing Block MB-102) v 5 ml roztoku 5% mléka. Poté byla membrána promyta v TTBS pufru (50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,05% v/v Tween 20; pH 7.6). Následně byla membrána inkubována přes noc v lednici při 4° C v 5 ml roztoku 5% BSA obsahující 4 µl primární protilátky proti MST1 proteinu (MST1Rabbit monoclonal Ab IgG), nebo v 5 ml roztoku 5% mléka obsahující 5 µl primární protilátky proti aktinu (Actin Goat polyclonal IgG). Další den byla membrána promyta 3 x 10 minut v pufru TTBS, poté blokována 45 minut v 5 ml roztoku 1% mléka obsahující 2 µl sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidasou proti králíčímu IgG (MST1), nebo kozímu IgG (aktin). Nakonec byla membrána promyta 3x 5 minut v TTBS pufru a namočena 30 s v roztoku pro vizualizaci, který obsahoval reagensy A a B (A: 0,1 M Tris o pH 8.8; 0,018% peroxid vodíku; B: luminol, kyselina kumarová). Smíšením obou reagensů vznikl chemiluminiscenční substrát, který se navázal na křenovou peroxidasu, která tento substrát přeměňuje na nestabilní produkt, jenž se stabilizuje vyzářením světla. Membrána byla focena kamerou CCD (ChemiDoc™MP Imaging System).

3.2.6. Měření proteolytické aktivity

Proteolytická aktivita byla měřena u vzorků GDC, GDC + Z-DEVD o koncentraci 2 μM a 5 μM . Vzorky byly připraveny tak, aby obsahovaly 50 μg proteinu a byly doplněny na 50 μl hypotonickým pufrem (150 mM MgCl_2). Ke každému vzorku se dále přidalo 50 μl pufru pro měření aktivity kaspas (20 mM PIPES o pH 7.4; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1% CHAPS; 10% sacharosa; 10 mM dithiothreitol) a 5 μl 8 mM specifického substrátu DEVD. Vzorky se nechaly inkubovat 30 minut při teplotě 37° C v inkubátoru a následně se každou minutu po dobu 1 hodiny měřila absorbance vzorků při konstantní teplotě 37° C.

DEVD je specifická peptidová sekvence, kterou váží kaspasy. Kaspasy štěpí specificky peptidovou vazbu za aspartátem. V průběhu měření zaznamenáváme přírůstek absorbance nitroanilinu, který se nachází v sekvenci za aspartátem. Průběh reakce je znázorněn na obr. 7.



Obr. 7 – Průběh reakce štěpení kaspas. Převzato a upraveno z [63].

Z-DEVD je inhibitor kaspas, který se kovalentně váže přes fluoro-methyl ketonovou skupinu na imidazol histidinu nacházejícího se v aktivním místě kaspas. Zabraňuje další vazbě specifického substrátu do aktivního místa kaspas, čímž je inhibuje. Struktura specifického inhibitoru Z-DEVD je znázorněna na obr. 8 na straně 38.



4. Výsledky

Z důvodu doposud neobjasněného molekulárního mechanismu aktivace MST1 jsme se zabývali jeho studiem, a to především otázkou, jakou úlohu v aktivačním procesu mají kaspasy. Při experimentech jsme pracovali s buněčnou linií Jurkat, buňky akutní lymfoblastické leukémie T-buněčné populace.

4.1. Stanovení koncentrace

Stanovení proteinů v buněčných lyzátech akutní lymfoblastické leukemie T-buněčné populace bylo prováděno při vlnové délce 562 nm na spektrofotometru (Synergy HT). Pro vypočtení koncentrace proteinů ve vzorcích byla využita rovnice přímky získaná lineární regresi kalibrační přímky, která byla sestavena z naměřených hodnot absorbance standardních vzorků BSA o známé koncentraci. Vypočtené koncentrace vzorků vynásobené ředěním jsou znázorněny v tabulce č. 2. Proteiny získané izolací byly dále využity.

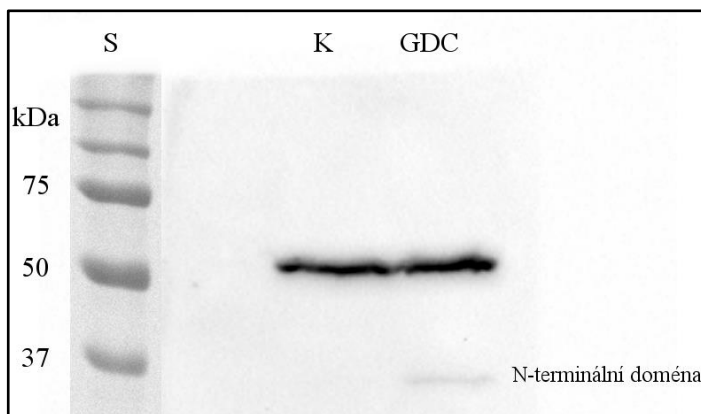
Tabulka č. 2: Vypočtené hodnoty efektivní koncentrace proteinů ve vzorcích. A značí absorbanci při vlnové délce 562 nm.

vzorek	A ($\lambda=562$ nm)	c $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Kontrola	0,309	1,413
GDC	0,290	1,286
GDC + 2 μM Z-DEVD	0,273	1,173
GDC + 5 μM Z-DEVD	0,258	1,073

4.2. Vliv GDC na aktivaci MST1

Nejprve byl zkoumán fakt, zda GDC-0941 skutečně aktivuje MST1 kinasu. MST1 je centrální součástí Hippo signální. Aktivní MST1 inhibuje onkoproteiny YAP a TAZ, které řídí transkripci antiapoptických, proliferačních a metabolických genů. Rozdělené proteiny SDS elektroforézou byly přeneseny na nitrocelulosovou membránu a po imunodetekci byly detekovány pomocí chemiluminiscence. Na obr. 9 na straně 40 je

viditelný fragment N-terminální domény MST1 o velikosti 36 kDa. Dále je z obrázku zřetelné, že biologicky aktivní látka GDC-0941 aktivuje MST1 kinasu.

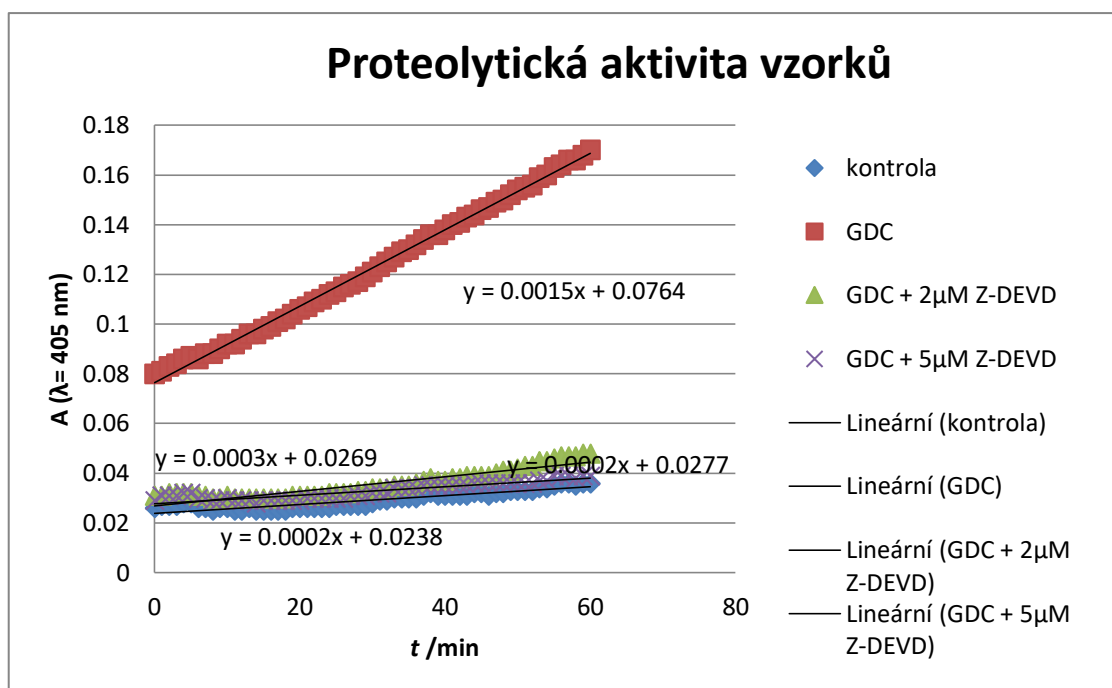


Obr. 9 – Výsledek imunodetekce MST1. Imunodetekce MST1 po ošetření buněk 10 mM GDC-0941.

S - standard a K – kontrola.

4.3. Proteolytická aktivita

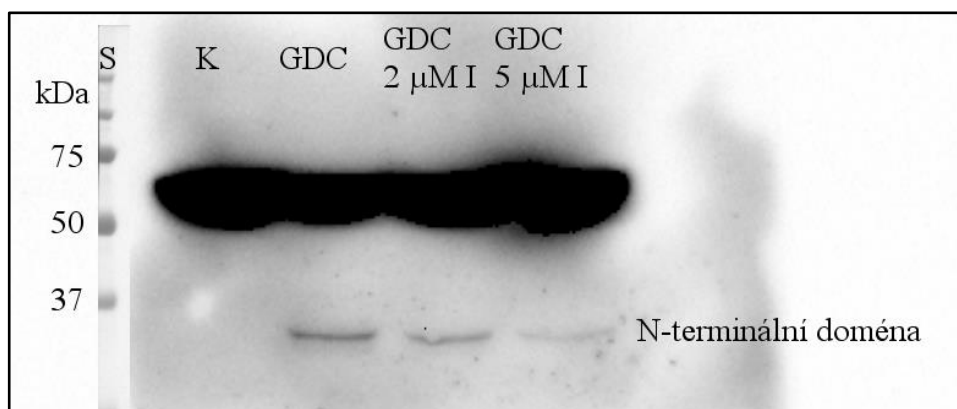
Proteolytická aktivita byla určena u vzorků zaznamenaných v tabulce č. 1 na straně 34. U vzorků byla zaznamenána každou minutu absorbance nitroanilinu při vlnové délce 405 nm. Z jednotlivých bodů pro všechny vzorky byla lineární regresí získána rovnice přímky, kde směrnice přímky značí proteolytickou aktivitu, která je znázorněna na obr. 10 na straně 41. Z grafu je zřejmé, že GDC kromě MST1 aktivuje také kaspasy. Proteolytická aktivita vzorku GDC je oproti kontrolnímu vzorku několikanásobně větší. Dále je z obrázku patrné, že specifický inhibitor Z-DEVD kaspasy opravdu inhibuje, proteolytická aktivita vzorků obsahující tento inhibitor je u 5 μ M koncentrace Z-DEVD srovnatelná s kontrolním vzorkem. Míra inhibice specifickým inhibitorem Z-DEVD je závislá na jeho koncentraci.



Obr. 10 – Graf proteolytických aktivit pro jednotlivé vzorky. GDC aktivuje kaspasy. Inhibice kaspas je závislá na koncentraci inhibitoru Z-DEVD, se zvyšující koncentrací se zvyšuje míra inhibice kaspas.

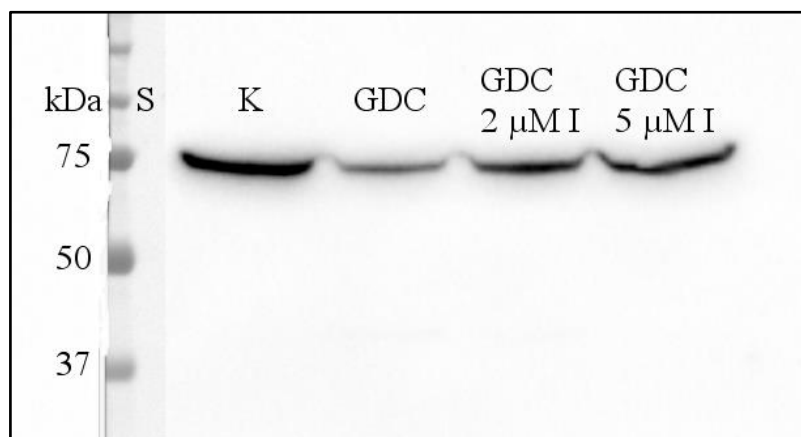
4.4. Imunodetekce MST1 po inhibici kaspas

Po inhibici kaspas byla opět testována aktivita MST1 kinasy. Proteiny přenesené na membránu byly vizualizovány chemiluminiscenčně. Výsledný blot je znázorněn na obr. 11. Aktivní protein MST1 je detekován u všech vzorků. Intenzita fragmentu N-terminální domény MST1 kinasy o velikosti 36 kDa slábne se zvyšující koncentrací inhibitoru Z-DEVD.



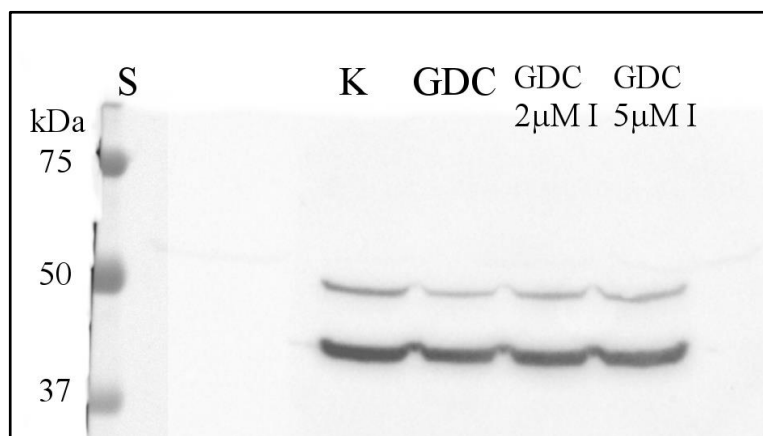
Obr. 11 – Imunodetekce MST1 kinasy vizualizováno po delší časové expozici. Imunodetekce MST1 kinasy po ošetření buněk 10 mM GDC a inhibitorem Z-DEVD. S – standard, K – kontrola a I – inhibitor Z-DEVD.

Obr. 12 znázorňuje stejný blot jako v případě obr. 11 na straně 41. Obrázky se liší pouze dobou expozice. Na obr. 12 je zřetelný úbytek celkové formy MST1 proteinu, což potvrzuje, že dochází k aktivaci MST1. Po krátké časové expozici nejsou fragmenty N-terminální domény o velikosti 36 kDa patrné.



Obr. 12 – Imunodetekce MST1 kinasy vizualizováno po krátké časové expozici. Imunodetekce MST1 kinasy po ošetření buněk 10 mM GDC a inhibítorem Z-DEVD. S – standard, K – kontrola a I – inhibitor Z-DEVD.

Pro kontrolu nanášky byl detekován u vzorků proteinu aktin o celkové molekulové hmotnosti 43 kDa. Dále je vidět, že množství monomerního aktinu v oblasti 43 kDa je shodné, což potvrzuje shodné množství proteinů v jednotlivých nanáškách.



Obr. 13 – Imunodetekce aktinu. Imunodetekce aktinu po ošetření buněk 10 mM GDC a inhibítorem Z-DEVD. S – standard, K – kontrola a I – inhibitor Z-DEVD.

5. Diskuse

MST1 kinasa je centrální složkou antiproliferační Hippo signální dráhy. Aktivace MST1 kinasy vede k redukci proliferace buňky a navození apoptosy [39]. Dále aktivovaná MST1 fosforyluje FOXO protein, který dále po translokaci do jádra způsobuje expresi proapoptických genů, což vede k inhibici buněčného cyklu a k indukci apoptosy [42].

Z výsledků imunodetekce MST1 kinasy plyne, že biologicky aktivní látka GDC-0941 je aktivátorem MST1. GDC-0941 patří mezi specifické inhibitory PI3K signalizace, proto v testovaných buňkách linie Jurkat dochází k inhibici MST1 proteinu prostřednictvím aktivní PI3K signální dráhy. Podobný mechanismus byl popsán i v jiných typech nádorů, kde fosforylace threoninu 120 vedla k inhibici MST1 proteinu v cytosolu [65]. Na obr. 9 na straně 40 a obr. 11 na straně 41 jsou zřetelné fragmenty N-terminální kinasové domény MST1 o velikosti 36 kDa. Fakt, že MST1 je aktivní i v případě, kdy jsou kaspasy inhibovány specifickým inhibitorem Z-DEVD, potvrzuje i obr. 12 na straně 42, kde pozorujeme úbytek celkové formy MST1 proteinu. Tento úbytek odpovídá míře štěpení MST1 proteinu a dokládá jeho aktivaci. Úbytek celkové formy proteinu je závislý na koncentraci specifického inhibitoru, se zvyšující koncentrací je úbytek celkové formy menší.

Dále na obr. 10 na straně 41 pozorujeme fakt, že GDC-0941 navíc aktivuje samotné kaspasy. Aktivní PI3K dráha způsobuje fosforylaci proapoptických genů, mezi které například patří BAD nebo FOXO a tím dochází k inhibici jejich aktivity. Tento fakt je zřejmý z porovnání kontrolního vzorku se vzorkem obsahujícím GDC. Dále tento obrázek dokazuje, že Z-DEVD skutečně aktivované kaspasy pomocí GDC inhibuje. U obou vzorků obsahujících specifický inhibitor je kaspasová aktivita srovnatelná s kontrolním vzorkem, který látku GDC-0941 neobsahuje.

Z našich experimentálních výsledků vyplývá, že kaspasy nemusí být výhradně zodpovědné za aktivaci a štěpení MST1 proteinu. Tyto výsledky jsou ve shodě s nedávno publikovanými články [42, 60, 61]. Štěpení MST1 může být způsobeno i jinými aspartátovými proteasami, které nejsou natolik efektivně inhibovány substrátem Z-DEVD. To vysvětluje pouze mírnou inhibici štěpení MST1 proteinu v průběhu specifické inhibice kaspas substrátem Z-DEVD. Proto bude v budoucnu nutné otestovat i inhibitory s odlišnou peptidovou sekvencí, které cílí odlišné skupiny cystein-aspartátových proteas. V naší

laboratoři byla nově indentifikována strukturní podobnost MST1 proteinu s cystein-aspartátovými proteasami. To vede k představě, že MST1 protein může vykazovat vlastní proteasovou aktivitu jako v případě kinasy Tiki1, která je součástí nekanonické Wnt signální dráhy a řídí vývoj žab rodu *Xenopus* [66]. Toto zjištění bude hlavním cílem následujícího výzkumu, který bude prováděn v naší laboratoři.

6. Závěr

Využitím metody Western blot, stanovením proteolytické aktivity pomocí specifického substrátu DEVD a cílené inhibice kaspas z experimentálních výsledků vychází, že štěpení MST1 kinasy nemusí být výhradně závislé na kaspasach.

7. Seznam použité literatury

- [1] “Nádorová onemocnění,” 3. 2. 2016. [Online] Dostupné:
<http://www.szu.cz/tema/prevence/nadorova-onemocneni>
- [2] B. Ficová, “Vliv léčby dětských onkologických pacientů na jejich život po ukončení léčby,” Diplomová práce, Pedagogická fakulta MU Brno, katedra sociální pedagogiky, 2012
- [3] A. C. Muntau, “Pediatrie,” Grada Publishing a.s., Praha, 2014
- [4] M. Protivánková, J. Vorlíček, “Chronická myeloidní leukemie: Informace pro pacienty a jejich blízké,” MU Brno – Kraví Hora, 2001
- [5] T. Latif, J. C. Morris, “Monoclonal antibody therapy of T-cell leukemia and lymphoma,” v knize “T- cell leukemia – Characteristic, treatment and prevention,” (M. Tomita), InTech, str. 33-45, 2013
- [6] M. J. Berridge, “Cell signalling biology,” Press Limited, Portland, 2014
- [7] G. Krauss, “Basics of cell signaling,” v knize “Biochemistry of Signal transduction and regulation,” Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 1-27, 2008
- [8] B. Otová, R. Mihalová, “Základy biologie a genetiky člověka,” Karolinum, Praha, 2012
- [9] A. Wodarz, R. Nusse , “Mechanisms of Wnt signaling in development,” *Annual review of cell and developmental biology*, 1998, 14 (1): 59-88
- [10] H. Clevers, “Wnt/ β -Catenin signaling in development and disease,” *Cell*, 2006, 127 (3): 469-480
- [11] B. T. MacDonald, K. Tamai, X. He, “Wnt/ β -Catenin signaling: Components, mechanisms and diseases,” *Developmental Cell*, 2009, 17 (1): 9-26
- [12] A. J. Mikels, R. Nusse, “Wnts as ligands: processing, secretion and reception,” *Oncogene*, 2006, 25 (57): 7461-7468

- [13] Y. Komiya, R. Habas, “Wnt signal transduction pathways, “ *Organogenesis*, 2008, 4 (2): 68-75
- [14] F. Werkaar, A. A. van der Doelen, J. F. M. Smits, W. M. Blankesteyn, G. J. R. Zeman, “Inhibition of Wnt/ β -Catenin Signaling by p38 MAP kinase Inhibitors is explained by cross – reactivity with Casein kinase I δ/ϵ ,“ *Chemistry & Biology*, 2011, 18 (4): 485-494
- [15] W. Kolch, “Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions,“ *The Biochemical journal*, 2000, 15 (351): 289-305
- [16] J. A. McCubrey, L. S. Steelman, W. H. Chappell, S. L. Abrams, E. W. Wong, F. Chang, B. Lehmann, D. M. Terrian, M. Milella, A. Tafuri, F. Stivala, M. Libra, J. Basacke, C. Evangelisti, A. M. Martelli, R. A. Franklin, “Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance,“ *Biochimica et biophysica Acta*, 2007, 1773 (8): 1263-1284
- [17] F. Meier, B. Schitteck, S. Busch, C. Garbe, K. Smalley, K. Satyamoorthy, G. Li, M. Herlyn, “The Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma,“ 2005, 10: 2986-3001
- [18] S. Y. Shin, O. Rath, S. M. Choo, F. Fee, B. McFerran, W. Kolch, K. H. Cho, “Positive- and negative- feedback regulations coordinate the dynamic behavior of the Ras – Raf – MEK – ERK – signal transduction pathway,“ *Journal of Cell Science*, 2009, 122: 425-435
- [19] B. B. Friday, A. A. Adjei, “Advances in targeting the Ras/Raf/MEK/ERK mitogen – activated protein kinase cascade with MEK inhibitors for cancer therapy,“ *Clinical cancer research*, 2008, 14 (2): 342-346
- [20] L. C. Platanitas, “MAP kinase signaling pathways and hematologic malignancies, “ *Blood*, 2003, 101 (12): 4667-4679
- [21] J. Karar, A. Maity, “PI3K/Akt/mTOR pathway in angiogenesis,“ *Frontiers in molecular neuroscience*, 2011, 4: 51
- [22] I. Vivanco, C. L. Sawyers, “The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer,“ *Nature reviews Cancer*, 2002, 2 (7): 489-501

- [23] A. Dasari, W. A. Messersmith, “New Strategies in Colorectal Cancer: Biomarkers of Response to Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies and Potential Therapeutic Targets in Phosphoinositide 3-Kinase and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways,” *Clin Cancer Res.*, 2010, 16: 3811-3818
- [24] J. Downward, “Mechanism and consequences of activation of protein kinase B/Akt,” *Current Opinion in Cell Biology*, 1998, 10 (2): 262-267
- [25] J. Luo, B. D. Manning, L. C. Cantley, “Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: Rationale and promise,” *Cancer Cell*, 2003, 4 (4): 257-262
- [26] M. Laplante, D. M. Sabatini, “mTOR Signaling in Growth Control and Disease,” *Cell*, 2012, 149 (2): 274-293
- [27] R. J. O. Dowling, I. Topisirovic, B. D. Fonseca, N. Sonenberg, “Dissecting the role of mTOR: Lessons from mTOR inhibitors,” *Biochimica et biophysica Acta*, 2010, 1804 (3): 433-439
- [28] J. LoPiccolo, G. M. Blumenthal, W. B. Bernstein, P. A. Dennis, “Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: Effective combinations and clinical considerations,” *Drug resistance Updates*, 2008, 11 (1-2): 32-50
- [29] A. J. Folkes, K. Ahmadi, W. K. Alderton, S. Alix, G. Brox, I. S. Chuckowree, P. A. Clarke, P. Depledge, S. A. Eccles, et al., “The identification of 2-(1H-indazol-4-yl)-6-(4-methanesulfonyl-piperazin-1-ylmethyl)-4-morpholin-4-yl-thieno[3,2-d]pyrimidine (GDC-0941) as a potent, selective, orally bioavailable inhibitor of class I PI3 kinase for the treatment of cancer,” *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008, 51 (18): 5522-5532
- [30] “Stemolecule™ GDC-0941,” 17. 4. 2016. [Online] Dostupné: <https://www.stemgent.com/products/show/153>
- [31] G. S. Wu, “The functional Interactions Between the MAPK and p53 Signaling Pathways,” *Cancer Biology & Therapy*, 2004, 3 (2): 156-161
- [32] F. Toledo, G. M. Wahl, “Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas,” *Nature Reviews Cancer*, 2006, 6 (12): 909-923

- [33] E. Bálint, K. H. Vousden, “Activation and activities of the p53 tumor supresor protein,“ *Journal of Cancer*, 2001, 85 (12): 1813-1823
- [34] R. S. Tibbetts, K. M. Brumbaugh, J. M. Williams, J. N. Sarkaria, W. A. Cliby, S. - Y. Shieh, Y. Taya, C. Prives, R. T. Abraham, “A role for ATR in the DNA damage – induced phosphorylation of p53,“ *Genes & Development*, 1999, 13: 152-157
- [35] J. Han, J. - D. Lee, Y. Jiang, Z. Li, L. Feng, R. J. Ulevitch, “Characterization of the Structure and Function of a Novel MAP Kinase Kinase (MKK6),“ *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271: 2886-2891
- [36] P. Jiang, W. Du, X. Wang, A. Mancuso, X. Gao, M. Wu, X. Yang, “p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase,“ *Nature Cell Biology*, 2011, 13 (3): 310-316
- [37] F. Schwartzenberg, M. Armoni, E. Karnieli, “The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression,“ *Cancer Research*, 2004, 64 (7): 2627-2633
- [38] J. Liu, C. Zhang, W. Hu, Z. Feng, “Tumor suppressor p53 and its mutants in cancer metabolism,“ *Cancer Letters*, 2015, 356 (2): 197-203
- [39] K. F. Harvey, X. Zhang, D. M. Thomas, “The Hippo pathway and human cancer,“ *Nature Reviews Cancer*, 2013, 13 (4): 246-257
- [40] M. M. Saccà, R. De Maria, “Hippo pathway and breast cancer stem cells,“ *Critical Reviews in Onkology/Hematology*, 2016, 99: 115-122
- [41] B. Zhao, Q. Y. Lei, K. L. Guan, “The Hippo-YAP pathway: new connections between regulation of organ size and cancer,“ *Current Opinion in Cell Biology*, 2008, 20 (6): 638-646
- [42] K. Vališ, L. Procházka, E. Boura, J. Chladová, T. Obšil, J. Rohlena, J. Truksa, L. F. Dong, S. J. Ralph, J. Neužil, “Hippo/Mst1 Stimulates Transcription of the Proapoptotic Mediator NOXA in a FoxO1 – Dependent Manner,“ *Cancer Research*, 2011, 71 (3): 946-954

- [43] Z. Tuháčková, "G – proteiny a přenos buněčných signálů," *Vesmír* 74, str. 5, 1995
- [44] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, "Molecular biology of the cell (6. vydání)," Garland Publishing, Inc., 2014
- [45] G. Krauss, "G Protein-Coupled Signal Transmission Pathways," v knize "Biochemistry of Signal transduction and regulation," Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 291-368, 2008
- [46] D. Purves, G. J. Augustine, D. Fitzpatrick, L. C. Katz, A.-S. LaMantina, J. O. McNamara, S. M. Williams, "Neuroscience (2. vydání)," Sinauer Associates, Sunderland, 2001
- [47] H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira, Ch. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, L. Zipursky, J. Darnell, "Molecular Cell Biology (5. vydání)," V. H. Freeman, New York, 2003
- [48] "G – proteiny," 9. 2. 2016 [Online] Dostupné: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-002_v1/hesla/g-proteiny.html
- [49] D. L. Cadena, G. N. Gill, "Receptor tyrosine kinases," *The FASEB Journal*, 1992, 6 (6): 2332-2337
- [50] J. Schlessinger, "Cell Signalling by Receptor Tyrosine Kinases," *Cell*, 2000, 103 (2): 211-225
- [51] P. Saikumar, Z. Dong, V. Mikhailov, M. Denton, J. M. Weinberg, M. A. Venkatachalam, "Apoptosis: Definition, mechanisms, and relevance to disease," *The American journal of medicine*, 1999, 107 (5): 489-506
- [52] T. J. Sayers, "Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy," *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60: 1173-1180
- [53] P. M. Eimon, E. Kratz, E. Varfolomeev, S. G. Hymowitz, H. Stern, J. Zha, A. Ashkenazi, "Delineation of the cell-extrinsic apoptosis pathway in the zebrafish," *Cell Death and Differentiation*, 2006, 13: 1619-1630
- [54] L. Galluzzi, I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, V. L. Dawson, et al., "Molecular definitions of cell

death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on cell Death 2012,“ *Cell Death and Differentiation*, 2012, 19 (1): 107-120

- [55] B. Favaloro, N. Allocati, V. Graziano, C. Di Ilio, V. De Laurenzi, “Role of Apoptosis in disease,“ *Aging*, 2012, 4 (5): 330-349
- [56] R. V. Rao, S. Castro-Obregon, H. Frankowski, M. Schuler, V. Stoka, G. del Rio, D. E. Bredesen, H. M. Ellerby, “Coupling Endoplasmic Reticulum Stress to the Cell Death Program,“ *The journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 (24): 21836-21842
- [57] R. C. Taylor, S. P. Cullen, S. J. Martin, “Apoptosis: controlled demolition at the cellular level,“ *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, 9 (3): 231-241
- [58] W. L. Cheunq, K. Ajiro, K. Samejima, M. Kloc, P. Cheunq, C. A. Mizzen, A. Beeser, L. D. Etkin, J. Chernoff, W. C. Earnshaw, C. D. Allis, “Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase,“ *Cell*, 2003, 113 (4): 507-517
- [59] B. Cinar, P.-K. Fang, M. Lutchman, D. Di Vizio, R. M. Adam, N. Pavlova, M. A. Rubin, P. C. Yelick, M. R. Freeman, “The pro-apoptic kinase MST1 and its caspase cleavage products are direct inhibitors of Akt1,“ *The EMBO Journal*, 2007, 26 (21): 4423-4607
- [60] A. Ardestani, F. Paroni, Z. Azizi, S. Kaur, V. Khobragade, T. Yuan, T. Frogne, W. Tao, J. Oberholzer, F. Pattou, J. K. Conte, K. Maedler, “MST1 is a key regulator of beta cell apoptosis and dysfunction in diabetes,“ *Nature medicine*, 2014, 20 (4): 385-397
- [61] D. P. Del Re, T. Matsuda, P. Zhai, Y. Maejima, M. R. Jain, T. Liu, H. Li, Ch.-P. Hsu, J. Sadoshima, “MST1 Promotes Cardiac Myocytes Apoptosis through Phosphorylation and Inhibition of Bcl-xL,“ *Molecular Cell*, 2014, 54: 639-650
- [62] “Western blot,“ 17. 4. 2016. [Online] Dostupné:
https://en.wikipedia.org/wiki/Western_blot
- [63] “The Hydrolysis of Ac-DEVD-pNa,“ 23. 4. 2016. [Online] Dostupné:
http://www.nature.com/nprot/journal/v5/n2/fig_tab/nprot.2009.223_F2.html

- [64] “Caspase-3 Inhibitor Z-DEVD-FMK,” 23. 4. 2016. [Online] Dostupné:
<http://www.biovision.com/caspase-3-inhibitor-z-devd-fmk-18.html>
- [65] F. K. Collack, K. Yagiz, D. J. Luthringer, B. Erkaya, B. Cinar, “Threonine-120 phosphorylation regulated by phosphoinositide-3-kinase/Akt and mammalian target of rapamycin pathway signaling limits the antitumor activity of mammalian setrile 20-like kinase 1,” *The Journal of biological chemistry*, 2012, 287 (28): 23698-709
- [66] X. Zhang, J. G. Abreu, C. Yokota, B. T. MacDonald, S. Singh, K. L. Coburn, S. M. Cheong, M. M. Zhang, Q. Z. Ye, H. C. Hang, H. Steen, X. He, “Tiki1 is required for head formation via Wnt cleavage-oxidation and inactivation,” *Cell*, 2012, 149 (7): 1565-1577

"Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů."

Jméno, příjmení, adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka